

取扱説明書

シカジーニース® MRSA関連遺伝子リアルタイムPCR検出キット
Cica Geneus® MRSA Related Gene Real Time PCR Detection KIT

1. はじめに

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は、メチシリンをはじめとするβ-ラクタム系抗菌薬に耐性を獲得した黄色ブドウ球菌です。MRSA は医療関連感染症の主要な原因菌であり、ヒトや物を介した接触感染によって院内感染を引き起こすため、定期的な監視と感染防止対策の実施が求められています。黄色ブドウ球菌は *mecA* 遺伝子を獲得することで MRSA になります。また、*mecA* 遺伝子を保有していない場合でも、*blaZ* 遺伝子を獲得することでペニシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Penicillin-resistant *S. aureus*: PRSA) になります。そのため、これらの遺伝子の検出は、MRSA と PRSA の推定に有効です。本キットは 4-plex のリアルタイム PCR で、黄色ブドウ球菌とその近縁種 (*S. aureus* complex) に特異的な *femA* 遺伝子と、薬剤耐性遺伝子の *mecA*, *blaZ*, さらに PCR 阻害の有無を確認するためのインターナルコントロール (IC) を同時に検出します。

2. 製品形態

製品名	シカジーニース® MRSA 関連遺伝子リアルタイム PCR 検出キット
製品番号	Cica Geneus® MRSA Related Gene Real Time PCR Detection KIT
製品番号	07512-96
容量	30 回分
保管温度	冷凍 (-25℃~-20℃)

3. キット構成 (30 回)

個別名称	容量
試薬 A (ラベル白)	AptaTaq DNA Master (5× Conc.)※1
試薬 B (ラベル赤)	PCR サプリメント
試薬 C (ラベル紫)	プライマー・プローブミックス
試薬 D (ラベル黄)	ポジティブコントロール

※1 AptaTaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K. の商品です。

4. 関連試薬 (別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニース® DNA 抽出試薬	120 回分	テンプレート調製
本キットは上記シカジーニース® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
72075	クロモアガー-MRSA/スタッフアウレウス 分画培地	10 枚×2	スクリーニング
72046	クロモアガー-MRSA スクリーン培地	10 枚	スクリーニング
08088-96	シカジーニース® トータル DNA ブレップ キット (組織用)	100 回分	DNA の精製
96930-23	CS-INL-01 滅菌ディスボルブ	1 μL 1000 本	釣菌

5. 原理

MRSA に関連する各遺伝子と特異的に結合するプライマー及び蛍光標識プローブを用いたマルチプレックス リアルタイム PCR によって、各遺伝子の増幅に伴う蛍光強度の上昇をリアルタイムに測定します。各プローブにはそれぞれ異なる蛍光色素が標識されており、検出された蛍光の種類から 3 種類の MRSA 関連遺伝子を判定します。

6. 適用範囲

3 種類の MRSA 関連遺伝子 (*femA*, *mecA*, *blaZ*)

7. 対応装置

FAM、VIC、ROX (Red610)、Cy5 の 4 種類の蛍光色素に対応したリアルタイム PCR 装置

社内検討にて性能確認済みの装置

- Thermo Fisher Scientific 社製 QuantStudio® 5
- Bio-Rad 社製 CFX Opus 96
- Roche Diagnostics 社製 LightCycler® 96

8. プロトコール

①テンプレート DNA の調製

選択分離培地 (クロモアガー-MRSA/スタッフアウレウス分画培地 (製品番号: 72075)) 等を用いて黄色ブドウ球菌疑いの菌株を単離し、別売のシカジーニース® DNA 抽出試薬 (製品番号: 08178-96) を用いて菌体から DNA を抽出して下さい。また、別売の DNA 精製キットであるシカジーニース® トータル DNA ブレップキット (組織用) (製品番号: 08088-96) を用いて調製した精製 DNA (1 ng/μL) もテンプレート DNA として利用できます。

* シカジーニース® トータル DNA ブレップキット (組織用) を黄色ブドウ球菌に使用する場合はバッファー GP とリゾスタフィンが必要です。詳しくは弊社までお問い合わせ下さい。

・シカジーニース® DNA 抽出試薬の使用法

- 1) 別途調製したシカジーニース® DNA 抽出試薬混合液 100 μL をマイクロチューブに入れて下さい。
- 2) 分離培養によって得られたコロニーを滅菌生理食塩水に懸濁し、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 3 番程度となるように菌液を調製して下さい。調製した菌液 10 μL を 1) のマイクロチューブに入れて軽く混和して下さい。
- 3) 72℃ で 6 分間、94℃ で 3 分間インキュベートして下さい。
- 4) 遠心分離し、その上清をテンプレート DNA 溶液として下さい。

②リアルタイム PCR

各試薬を室温で融解して下さい。融解後、直ちに転倒混和もしくはタッピングで穏やかに混和してスピンドアウン後、氷冷して下さい。表 1 に従って PCR 反応液を PCR チューブに調製して下さい。検体と同時に必ずポジティブコントロール (試薬 D) を試験して下さい。なお、調製した PCR 反応液の室温放置は避けて下さい。

表 1 PCR 反応液の調製

試薬	液量
テンプレート DNA 溶液※2	5.0 μL
試薬 A (AptaTaq DNA Master)	4.0 μL
試薬 B (PCR サプリメント)	6.0 μL
試薬 C (プライマー・プローブミックス)	5.0 μL
合計	20.0 μL

※2 ポジティブコントロール (試薬 D)、ネガティブコントロール (TE Buffer、スクレーパーゼフリー水等) を検体にする場合は、テンプレート DNA 溶液と置き換えて使用して下さい。

リアルタイム PCR 用のキャップもしくはシールをした PCR チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし、下記の条件で PCR を行なって下さい。

94℃: 15 秒
60℃: 60 秒 * } 35 回繰返し

* 蛍光検出: FAM、VIC、ROX (Red610)、Cy5

(リアルタイム PCR 装置によっては ROX 補正を無効化する必要があります)

9. 判定

表 2 を参考に MRSA 関連遺伝子の有無を判定します。

ポジティブコントロールで全ての遺伝子が検出されていることを確認した上で、検体の判定を行なって下さい。ポジティブコントロールで何れかの遺伝子が検出されない場合は、試験が正常に行なわれていないため、再試験を行なって下さい。また、ネガティブコントロールで IC 以外の遺伝子が検出された場合は、コンタミネーションが疑われるため、再試験を行なって下さい。リアルタイム PCR 装置の解析ソフトによって Ct (Cq) 値が算出された場合も、必ず増幅曲線が立ち上がっていることを確認した上で判定を行なって下さい。検体で IC が検出されない場合は、PCR 阻害による偽陰性が疑われるため、再試験を推奨しています。

表 2 検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター

検出対象遺伝子	蛍光検出フィルター
<i>femA</i> ※3	FAM
<i>mecA</i>	VIC
<i>blaZ</i>	ROX (Red610)
IC	Cy5

※3 *femA* は *S. aureus* complex 特異的遺伝子として検出します。



取扱説明書

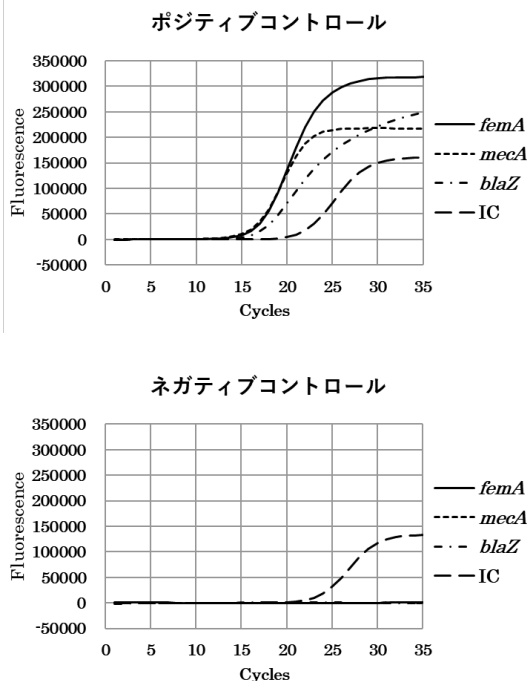
シカジーニアス® MRSA関連遺伝子リアルタイムPCR検出キット
Cica Geneus® MRSA Related Gene Real Time PCR Detection KIT

図 検出例(ポジティブコントロール(試薬 D)、ネガティブコントロールとして TE Buffer を試験した際の増幅曲線)

(Thermo Fisher Scientific 社製 QuantStudio® 5 Dx 使用)

10. 使用上の注意事項

- 1) 本キットで *mecA* または *blaZ* 遺伝子が検出されても、遺伝子の変異や発現等の影響で、抗菌薬に耐性を示さない場合があります。
- 2) 適用範囲の遺伝子であっても、垂型によっては検出されない場合があります。
- 3) テンプレート DNA の濃度が高すぎると偽陽性、低すぎると偽陰性を生じる可能性があります。テンプレート DNA の調製は 8. プロトコルに従って行なって下さい。
- 4) 本キットでは、*S. aureus* complex (*S. aureus*, *S. argenteus*, *S. schweitzeri*, *S. roterodami*, *S. singaporensis*) が保有する *femA* 遺伝子を検出します。
- 5) 菌株の保管状況によっては、プラスミド上に存在する *blaZ* 遺伝子が脱落する場合があります。
- 6) 検体やポジティブコントロールが各試薬や PCR 反応液、ネガティブコントロールに混入しないよう注意して下さい。コンタミネーションの影響を確認するため、ネガティブコントロール(TE buffer、ヌクレアーゼフリー水等)を同時に試験することを推奨します。
- 7) 各試薬は、凍結融解を繰り返すと性能が低下する可能性があります。一度に使用しきれない場合は、小分けして -25℃~-20℃ で保存して下さい。
- 8) 試薬の小分けを行なう場合、ヌクレアーゼや試薬間のコンタミネーションを防止するため、手袋とマスクを着用して、試薬毎に新しいフィルター付きデイスポーズバルチップを用いる等、操作には細心の注意を払って下さい。
- 9) 本キットには蛍光色素が含まれるため、遮光して保存して下さい。
- 10) PCR 反応液の室温放置は結果に影響を及ぼす可能性があります。反応液の調製は、氷上または PCR クーラーの使用を推奨します。
- 11) リアルタイム PCR 装置の取扱は、それぞれの装置の取扱説明書に従って下さい。
- 12) 使用されるリアルタイム PCR 装置によっては、温度制御誤差や昇温スピード等の違いにより、PCR 条件の最適化が必要な場合があります。
- 13) 使用されるリアルタイム PCR 装置によっては、蛍光色素のキャリブレーションが必要となる場合があります。
- 14) PCR で 95℃ 以上の加温を行なうと、DNA 合成酵素の活性が著しく低下する場合があります。
- 15) PCR チューブは必ず使用するリアルタイム PCR 装置に合わせて、推奨されたものをお選び下さい。
- 16) 増幅曲線が立ち上がっていない場合でも、ノイズや装置によるベースライン補正の影響で Ct(Cq) 値が算出されることがや、自動判定等で陽性となることがあります。必ずポジティブコントロールの蛍光強度と比較して判定を行なって下さい。

11. その他

- 1) 本キットは研究用として販売しております。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
- 2) 他メーカーの製品に関するライセンス・パテントについては、各メーカーにご確認下さい。
- 3) 製品の仕様は、製品の改良のため変更する場合がございます。あらかじめご了承下さい。
- 4) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、関係法令に従って処理して下さい。

